

# ヒト食道扁平上皮癌に対する分子生物学的解析；特にその発癌機構についての解析

著者	森 隆弘
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/54766">http://hdl.handle.net/10097/54766</a>

博士論文

ヒト食道扁平上皮癌に対する  
分子生物学的解析；  
特にその発癌機構についての解析

東北大学大学院医学系研究科外科学系専攻（第2外科）

森 隆弘



①

博士論文

ヒト食道扁平上皮癌に対する  
分子生物学的解析；  
特にその発癌機構についての解析

東北大学大学院医学系研究科外科学系専攻（第2外科）

森 隆弘



## 要 旨

食道扁平上皮癌の分子生物学的特性を検討するため、93例の食道扁平上皮癌について各染色体の Loss of heterozygosity (LOH) の検索を行った。この結果、第3染色体短腕、第3染色体長腕、第5染色体長腕、第9染色体短腕、第9染色体長腕、第10染色体短腕、第13染色体長腕、第17染色体短腕、第17染色体長腕、第18染色体長腕、第19染色体長腕、及び第21染色体長腕に高頻度の染色体欠失を検出した。更に臨床及び病理学的所見との相関を検討したところ、第17染色体長腕欠失と女性患者が、また、第19染色体長腕欠失とリンパ節転移が相関を示した。第17染色体長腕欠失に関して欠失地図を作製したところ、その共通欠失領域は第17染色体長腕21でありBRCA1の近傍であった。次いで食道扁平上皮癌の発癌のメカニズムを検討するため、早



期癌および上皮異形成について染色体欠失を検討し第3染色体短腕、第9染色体長腕が軽度の上皮異形成より欠失し、第9染色体短腕、第17染色体短腕が高度の上皮異形成あるいは粘膜内癌の段階より欠失していた。また、第9染色体短腕の候補領域よりp16が単離され、食道癌における遺伝子変異を検出した。



## **ABSTRACT**

Allelotype of the esophageal carcinoma was examined in order to clarify candidate loci involved in carcinogenesis and/or progression of squamous cell carcinoma of the esophagus, and frequent deletions on several loci were observed. Comparison of the loci frequently deleted with clinicopathological data revealed correlation between 17q deletion and female cases, and correlation between 19q deletion and lymphnode metastasis. Deletion-mapping study on 17q showed the region commonly deleted was 17q21, where genetic linkage analysis revealed the BRCA1 locus. Further, LOH in epithelial dysplasia and early cancer of the esophagus was examined. Four loci showed frequent LOH in early carcinoma; 3p21.3, 9p22, 9q31, and 17p13. Further, chromosomal bands on 3p21.3 and 9q31 were deleted even in low-grade dysplasia, although 9p22 and 17p13 were not deleted in any case in low-grade group. The p16 gene, isolated from candidate locus on 9p22, was mutated in some cases of the esophageal carcinoma. These results suggest that accumulation of genetic alterations may play an important role in the genesis and/or progression of squamous cell carcinoma of the esophagus.



**Key words:** allelotype of the esophageal carcinoma; esophageal carcinogenesis; p16 mutation in esophageal carcinoma; accumulation of genetic alterations.



## A B S T R A C T (和 訳)

食道扁平上皮癌の発癌、増悪に関与する癌抑制遺伝子あるいは遺伝子座を検討するため、初めに食道癌の *allele type* を調べた。その結果、染色体 3 p, 3 q, 5 q, 9 p, 9 q, 10 p, 13 q, 17 p, 17 q, 18 q, 19 q, 21 q における高頻度の欠失が検出された。また、臨床、病理学的所見と比較すると 17 q の欠失と女性患者が、19 q の欠失とリンパ節転移が、それぞれ相関を認めた。更に 17 q における詳細な欠失地図を作製したところ、共通欠失領域は 17 q 21 となり、遺伝的連鎖解析により予想された B R C A 1 に近いことがわかった。

次に上皮異形成と早期癌における L O H の検索を行い、早期癌においては 3 p 21.3、9 p 22、9 q 31、17 p 13 の欠失が他に比べて高頻度であることがわかった。更に 3 p 21.3、9 q 31 は軽度の上皮異



形成から欠失しているのに対し、9 p 2 2 および 1 7 p 1 3 は高度異型上皮あるいは癌においてのみ欠失し軽度異型上皮では欠失していなかった。

また、9 p 2 2 における候補遺伝子 p 1 6 において幾つかの例で遺伝子変異を認めた。

以上の結果より、食道扁平上皮癌においても多段階的に癌抑制遺伝子の異常が生じ、その積み重ねにより悪性度を増していくことが示唆された。



## 研究背景

近年の分子生物学の発展は腫瘍がDNAの異常により発生、増悪していくことを明らかにした。特に大腸癌においてはそのモデル疾患とも言うべき家族性大腸ポリポシス症が存在したことから、所謂 adenoma-carcinoma sequence における多段階発癌モデルが提唱され<sup>(1)</sup>、また、それに関与する癌抑制遺伝子が単離され、あるいは既知の癌遺伝子や癌抑制遺伝子の関与が明らかにされた<sup>(2-6)</sup>。実際に一般の大腸癌においてもこれらの癌抑制遺伝子および癌遺伝子の異常が多段階的に集積することにより悪性度が増していくことが証明されている<sup>(7)</sup>。最近では遺伝性非ポリポシス性大腸癌 (HNPCC; hereditary non-polyposis colorectal cancer) における解析を中心に Mismatch repair system の異常と消化器癌との関



係が明らかにされ<sup>(9)</sup>、病理組織診断との関連や多重癌との関係も報告されている<sup>(10、11)</sup>。また、Mismatch repair systemの異常による遺伝子の不安定性は腫瘍における遺伝子変異や染色体の増幅、欠失との関係も考えられる。大腸癌以外の腫瘍に対しても分子生物学的に解析され始めてきており、いずれ全ての腫瘍の特徴が分子生物学的に明らかにされることが期待される。

### 研究目的

食道癌に対してはp53遺伝子やサイクリンD1などの報告があるが系統的な解析は未だ不十分であると思われる。これは大腸癌における家族性大腸ポリポーシス症のような遺伝的モデル疾患が存在しないことや、食餌、喫煙嗜好など外部環境の影響が大きいため遺伝的背景が比較的少なくなっているなどの理由が考えられる。従って、その原因遺伝子を探る際には多発家系における遺伝的連鎖解析



によらず、多数の一般の食道癌に対して、更に前癌病変と考えられる上皮異形成において allele type study を行い、その発癌過程を明らかにしようとした。



## 研究方法及び対象

(1) Allelotype study は 92 例の進行食道扁平上皮癌及び 1 例の早期癌 (sm, n(-)) を対象とした。このうち 48 例は食道癌多発地帯である中国 Hebei Medical College において切除された。23 例は癌研究所付属病院、22 例は東北大学医学部付属病院で切除された。全例、組織学的に扁平上皮癌の診断を受けている。これらは手術室において腫瘍部及び正常粘膜を採取した後、液体窒素により凍結、 $-80^{\circ}\text{C}$  冷凍庫に保存した。別記の如くプロテナーゼ K 及びドデシル硫酸ナトリウム処理により DNA を抽出し<sup>(12)</sup>、Taq I や Msp I など多型性を示す制限酵素で切断した。サザンブロット法によりナイロン膜に転写し、表 1 に示すような VNTR マーカーを含む RFLP マーカーにて LOH を検索した<sup>(13)</sup>。RFLP マーカーは多型性を示すフラグメントのみを分



離し、random primer extension 法にて [ $^{32}\text{P}$ ] dCTP によりラベルした<sup>(14)</sup>。LOH の検索はデンシトメトリ (GS-300 scanning densitometer; Hoefer Science Instruments) により量的に解析され、50% 以上の減少をもって LOH とした。

(2) 第 17 染色体長腕については表 2 に示した 15 個の、VNTR マーカーを含む RFLP マーカーにより検討した。対象は(1)で述べた 93 例で、方法も(1)に準じたサザンブロット法による LOH 検索によった。尚、15 個の、VNTR マーカーを含む RFLP マーカーは報告されているように fluorescence in situ hybridization (以後、FISH 法) により 17q における局在、順列が決められている<sup>(15)</sup>。

(3) 食道早期癌や特に上皮異形成に関してはその病理学的診断が困難なことが多い。



このため、より診断に客観性を持たせるため癌研究所病理部の二名の病理医により診断された標本のみを使用した。すなわち、ホルマリン固定、パラフィン標本より10  $\mu$ mの連続切片を準備し、そのうちの1スライスを病理診断に使用するためヘマトキシリン、エオジン染色した。病理医により顕微鏡下に病変部及び正常粘膜を切除、1.5 ml チューブに集めキシレンにより脱パラフィン後、ドデシル硫酸ナトリウム、プロテナーゼK処理によりDNAを抽出した<sup>(16)</sup>。また、診断をより確実にするため、また各々の混入を防ぐため、非連続性病変のみの21例の早期癌及び11例の上皮異形成を対象とした。マイクロサテライト領域をP o l y m e r a s e c h a i n r e a c t i o n 法（以下、P C R 法）により増幅しL O H を検討した。この際に前述したa l l e l o t y p e s t u d yにより高頻度の欠失を認めた染色体上で、これまでの食道癌及び



扁平上皮癌におけるLOH検索や遺伝子異常の検討の報告を参考にして候補領域を絞った(表3)。即ち、肺癌における欠失地図及び肺扁平上皮癌の高頻度欠失より3p21.3<sup>(17)</sup>とした。食道癌におけるAPC遺伝子座及びDCC遺伝子座の染色体欠失の報告より5q21、18q21<sup>(18)</sup>とした。頭頸部癌及び肺扁平上皮癌の欠失地図より9p22<sup>(19、20)</sup>とした。遺伝性皮膚疾患であるMultiple self-healing squamous epitheliomata(以下ESS1; 常染色体優性で皮膚に繰り返し腫瘍を生じる疾患で、腫瘍の病理組織像は高分化扁平上皮癌に極めて類似するとされる。)の遺伝的連鎖解析<sup>(21)</sup>や皮膚基底細胞癌のLOH検索<sup>(22)</sup>より9q22-q31とした。Retinoblastoma gene(以下RB)のmRNA異常の報告より13q14<sup>(23)</sup>(RB1遺伝子座; また、遺伝的連鎖解析に



より癌抑制遺伝子BRCA2がこの近傍に存在することが最近報告された。<sup>(24)</sup>とした。  
p53遺伝子の点変異の検索より17p13  
(TP53遺伝子座)<sup>(25)</sup>、及び前述した  
17qの欠失地図より17q21<sup>(26)</sup>、と  
した。前述したallelotype studyにお  
けるリンパ節転移と19qとの相関が見られ  
たことより19qテロメアとした。以上の遺  
伝子座に報告されているマイクロサテライト  
領域(表4)について検討した。

(4)(1)により得られたうちの27例の  
それぞれ正常部及び腫瘍部よりのDNAに対  
して下記プライマーによりp16(MTS1/  
CDK4I)のexon2を増幅し、  
pBluescript(Stratagene)にサブ  
クローニングした後、ジデオキシ法により塩  
基配列を決定した<sup>(27)</sup>。

(PCRプライマー)

5' - T A T A A G C T T G G C T C T A C A C A A G



C T T C C T T - 3 '

5 ' - T A T T C T A G A T G A G C T T T G G A A G

C T C T C A G - 3 '



## 結 果

( 1 ) 食 道 扁 平 上 皮 癌 に お け る a l l e l o -  
t y p e s t u d y 及 び 臨 床 病 理 学 的 デ ー タ ー  
と の 相 関 ;

食 道 扁 平 上 皮 癌 9 3 例 の a l l e l o t y p e  
s t u d y に よ り ( 図 1 、 表 4 ) 第 3 染 色 体 短  
腕 ( 以 下 3 p ) に 3 5 % 、 第 3 染 色 体 長 腕 ( 以  
下 3 q ) に 3 0 % 、 第 5 染 色 体 長 腕 ( 以 下 5  
q ) に 3 6 % 、 第 9 染 色 体 短 腕 ( 以 下 9 p )  
に 5 7 % 、 第 9 染 色 体 長 腕 ( 以 下 9 q ) に 6  
0 % 、 第 1 0 染 色 体 短 腕 ( 以 下 1 0 p ) に 3  
3 % 、 第 1 3 染 色 体 長 腕 ( 以 下 1 3 q ) に 4  
3 % 、 第 1 7 染 色 体 短 腕 ( 以 下 1 7 p ) に 6  
2 % 、 第 1 7 染 色 体 長 腕 ( 以 下 1 7 q ) に 4  
6 % 、 第 1 8 染 色 体 長 腕 ( 以 下 1 8 q ) に 3  
8 % 、 第 1 9 染 色 体 長 腕 ( 以 下 1 9 q ) に 3  
2 % 、 及 び 第 2 1 染 色 体 長 腕 ( 以 下 2 1 q )  
に 3 7 % の 高 頻 度 の 欠 失 を 認 め た 。 こ れ は こ  
れ ま で の a l l e l o t y p e s t u d y に よ り 非 特



異的な染色体の欠失が20%前後見られることが報告されており<sup>(28)</sup>、また、今回の検討から計算されたFAL (fractional allelic loss) が0.2618であったことから30%以上を有意に高頻度であると考えたためである。従って、食道扁平上皮癌の発癌、増悪に関与する癌抑制遺伝子は少なくとも3p、3q、5q、9p、9q、10p、13q、17p、17q、18q、19q、及び21qに存在することが示唆された<sup>(13)</sup>。

これらの欠失と臨床病理学的所見との相関を検討したところ17qの欠失と女性の食道癌患者が、また、19qの欠失とリンパ節転移がそれぞれ強い相関を示した(表5a, b)。

(2) 17qにおける詳細な欠失地図による検討；

17qにおいてはここに存在する15個のRFLPマーカー(VNTRマーカーを含む)により詳細な欠失地図を作製し(表2)、そ



の共通欠失領域を検索したところ 17q21 になることを証明した (図 2) <sup>(26)</sup>。これは遺伝的連鎖解析により予測された癌抑制遺伝子 BRCA1 の存在する領域に極めて近接していた <sup>(29, 30)</sup>。更に女性の食道癌患者に限ると 19 例中 16 例に 17q の欠失が見られていた (表 6)。

### (3) 食道上皮異型性及び早期癌における LOH、replication error の検討；

早期食道癌及び上皮異形成においての Loss of heterozygosity (以下、LOH) を検索した結果を表 7 に示す。図 1 及び表 1 に示したような進行癌における LOH の結果と比較すると 3p、9p、9q、17p の欠失は早期癌においても高頻度に見られるのに対し他の遺伝子座の欠失頻度は低い。上皮異形成を WHO の分類に沿い mild, moderate, severe と分類し、更に病理医により low-grade group と high



grade group の 2 群に分類されており、  
9 p、17 p の LOH は high-grade  
group では高率であるのに対し low-  
grade group では低い (表 8)。一方、  
3 p、9 q の欠失は low-grade group から  
進行癌まで一貫して高頻度である。3 p の  
欠失は low-grade group、high-  
grade group、早期癌ともに高頻度であ  
るが、進行癌においてはその頻度は比較的  
低い。これは LOH を検索した遺伝子座が異  
なると考えられる。すなわち、進行癌の  
allelotype study に使用した RFLP マ  
ーカー (VNTR マーカー) の D3S659 (3  
p13)、D3S515 (3p21-22) より  
D3S966 が癌抑制遺伝子に近いものと考え  
られる。また、p53 免疫染色による検討  
も行い、low-grade group においては  
染色される例は全く見られなかったが、  
high-grade group 以上では染色される



例が見られた。以上の結果について更に連続性病変について検討した。連続性病変の場合、上皮異形成や癌は各々極めて微細な病変であることが多く、この場合抽出されるDNAは微量である。このため連続性病変に関しては上記4領域に限った。結果は表9に示した。3p21.3、9q31においては上皮異形成 (low-grade group) から癌にかけて共通のアレルの欠失が見られた。一方、9p22、17p13はlow-grade groupでは両アレルは保持されており、high-grade groupあるいは癌においてアレルの欠失が見られた<sup>(31)</sup>。また、3例の上皮異形成においてreplication error (以下、RER) が観察された。3例中1例については非連続性に多発した早期癌についても検討しており、これにはRERが見られなかった (図3)<sup>(32)</sup>。

#### (4) 食道癌におけるp16遺伝子異常



前述したように食道癌において 9 p 2 2 は扁平上皮異形成の悪性化に関与する癌抑制遺伝子が存在すると考えており、この候補領域より家族性メラノーマの原因遺伝子として単離された p 1 6 が食道癌にも関係しているのではないかと考え遺伝子異常を検索した。この結果、27例中14例において体細胞性の遺伝子変異が検出された（図4、表10）<sup>(33)</sup>。しかし、上記連続性の上皮異形成、早期癌の病変においては遺伝子異常は検出されなかった。

### 考 察

(1) 進行食道扁平上皮癌における染色体、遺伝子異常；

Allelotype studyの結果、食道扁平上皮癌の発癌、増悪に関与する癌抑制遺伝子は少なくとも3 p、3 q、5 q、9 p、9 q、10 p、13 q、17 p、17 q、18 q、19 q、21 qに存在していることが示唆され



た。93例中92例がmp以上あるいはリンパ節転移陽性の所謂進行癌であり、この結果から進行癌においては様々な領域の染色体欠失が生じていることがわかる。言い替えれば進行癌においては多数の癌抑制遺伝子の不活化が起きている可能性が示唆された。また、染色体欠失と臨床病理学的データとの相関より17qに存在する癌抑制遺伝子が特に女性における食道扁平上皮癌に関与し、また、19qに存在する癌抑制遺伝子がリンパ節転移に関係している可能性が示唆された。一方、中国人、日本人における染色体欠失頻度は3p、5q、9p、9q、13q、17p、17q、18qでそれぞれ31%と44%、33%と42%、67%と42%、52%と73%、34%と39%、61%と63%、55%と32%、29%と50%であった。9p、17qにおける中国人での高頻度の欠失、及び18qにおける日本人での高頻度の欠失が著



明である。その意義については今後の検討に委ねられるが、食道癌の病因論とも関係する興味あるテーマだと思われる。更に 17q における詳細な欠失地図による検討より、BRCA1 ないしはその近傍に位置する癌抑制遺伝子が食道扁平上皮癌の発癌、増悪に関与している可能性が示唆され、女性食道癌患者との相関を考えると極めて興味深い。BRCA1 の候補遺伝子は最近米国のグループにより単離されたが<sup>(34)</sup>、一部にチンクフィンガードメインを持つことから転写因子の可能性も考えられ、その異常が乳癌、卵巣癌に限らず他の癌にも関係することは十分考えられる。今後の遺伝子異常の検討が期待される。また、食道癌を高頻度で合併する角化異常症 tylosis の家系における遺伝的連鎖解析により、その原因遺伝子が 17q12-21 に連鎖することが最近報告され<sup>(35)</sup>、その単離が期待される。



( 2 ) 食道扁平上皮癌の発癌過程における  
多段階的染色体、遺伝子変異；

食道上皮異型性及び早期癌における  
LOHの検討より図5に示すような食道扁平  
上皮癌の発癌、増悪の分子生物学的過程を推  
測した。即ち、3p21.3及び9q31に  
存在する未知の癌抑制遺伝子の不活化により  
食道扁平上皮の異形成化が生じ、9p22及  
び17p13に存在する癌抑制遺伝子の不活  
化により上皮異形成の悪性度が増して癌化し  
ていくのではないかとする仮説である。3p  
21.3には肺癌との共通の癌抑制遺伝子が、  
また、9q31にはESS1や皮膚基底細胞癌  
との共通の癌抑制遺伝子があると予想される。  
詳細は遺伝子が単離されなければ不明である  
が、食道扁平上皮細胞の異型化の初期に皮膚、  
肺などの扁平上皮と共通の癌抑制遺伝子によ  
るとする仮説はAPC遺伝子が大腸癌の初期  
(正常粘膜細胞の腺腫化)のみならず胃腺癌



において異型上皮の段階から遺伝子異常が観察されたことから十分に考えられる<sup>(36)</sup>。

一方、17p13に関してはp53遺伝子座(TP53)自体の欠失を検討しており、また、食道癌においては17pの欠失とp53遺伝子の点変異の相関が報告されていることや<sup>(37)</sup>、p53免疫染色の結果からも、p53遺伝子異常の結果であろうと考えられる。即ち、p53の異常により軽度の異型上皮が高度の異型上皮へ、あるいは粘膜内癌へ進行するものと考えられる。これは一般の大腸癌においてp53遺伝子変異により腺腫が癌に進行するとされていることとほぼ同じ段階における変化である<sup>(7)</sup>。

また、前述したようにp16が食道癌で変異している例もあり、9p22の欠失はp16の変異を反映していると考えられる。p16はCDK4(cyclin dependent kinase 4)と結合することにより、



C D K 4 と c y c l i n D が 共 同 し て 細 胞 周 期 を 進 め る の を 阻 害 し G 1 期 停 止 の 状 態 に す る ( 3 8 ) 。 従 っ て 、 p 1 6 の 異 常 に よ り 細 胞 は G 1 期 停 止 か ら 逸 脱 し 増 殖 を 続 け て い く と 考 え ら れ 、 こ れ は p 5 3 異 常 に よ る 細 胞 増 殖 と ほ ぼ 同 じ で あ る 。 し か し 、 9 p 2 2 に 連 鎖 す る 家 族 性 メ ラ ノ ー マ に お い て p 1 6 に 遺 伝 子 変 異 が 見 ら れ る 例 と 見 ら れ な い 例 が あ り ( 3 9 , 4 0 ) 、 ま た 、 食 道 癌 に お い て も 9 p に L O H を 認 め る 例 で p 1 6 に 遺 伝 子 変 異 を 検 出 し 得 な か っ た 例 が 約 半 数 あ り 、 更 に 別 の 癌 抑 制 遺 伝 子 が 存 在 し て い る 可 能 性 が あ る 。

い ず れ に せ よ 、 p 5 3 、 p 1 6 は 共 に G 1 期 停 止 に 関 係 し 細 胞 周 期 を 調 節 す る 蛋 白 で あ り 、 こ の 両 者 が 変 異 す る こ と に よ り 前 癌 状 態 に あ る 細 胞 が G 1 期 停 止 に よ る 細 胞 周 期 管 理 を 逸 脱 し 、 癌 化 し て い く の で は な い か と 考 え ら れ る 。

ま た 、 今 回 は 癌 遺 伝 子 の 解 析 は 行 わ な か



ったが、食道癌において遺伝子増幅がみられる E G F R、c y c l i n D 1 などの解析も今後必要であろう。

一方で *d e n o v o* 発癌の問題がある。これは所謂前癌病変を経ない発癌を指すが、食道癌の自然史においては *d e n o v o* 癌がどのような意義およびどれくらいの頻度であるのか不明である。しかし、特に近年増加してきた早期粘膜内癌などの病理から、多くの扁平上皮癌は粘膜基底層からの異形化、悪性化から由来すると考えられており、粘膜全層が同時に癌化を来すような経路は考えにくい。また、大腸の *d e n o v o* 癌の分子生物学的解析により示されたように<sup>(41)</sup>、*d e n o v o* の癌とは複数の遺伝子の変異が一度に、あるいは急激に重なり発症したものとも考えられる。従って、食道癌の場合でも前癌病変の異形上皮から癌化までの経路を推察した本発癌モデルが *d e n o v o* の癌においても同様に、しか



し、同時に、あるいは極めて短い期間に多数の変異を重ねたものと考えらる。

染色体欠失の積み重ねにより食道扁平上皮細胞が異型度を増していくこと、更に、病理学的組織所見との関連が今回の検討で示唆された。逆に今後は遺伝子的変異を病理診断に应用することが必要となろう。これに関して 3 p 2 1 . 3、9 q 3 1 における未知の癌抑制遺伝子、9 p 2 2 の少なくとももう一つの癌抑制遺伝子の単離が重要である。癌抑制遺伝子の単離に向けた遺伝学的アプローチ及び遺伝子の機能解析など細胞生物学的なアプローチなど、さらなる検討が必要である。現在の癌研究は細胞周期、転写因子、接着因子、そして増殖シグナル伝達系へと進んでおり、今後の解析に期待される。



## 結 論

食道扁平上皮癌の早期癌、進行癌、及び上皮異形成に対して分子生物学的解析を行った。その結果、以下のことが明らかになり、あるいは、推測された。

( 1 ) 食道扁平上皮癌の a l l e l o t y p e s t u d y では多数の染色体欠失領域を検出した。食道扁平上皮癌の発癌、増悪には多数の癌抑制遺伝子の不活化が関係しているらしい。

( 2 ) 特に早期の変化 ( 上皮の異形成化 ) には 3 p 2 1 . 3 , 及び、9 q 3 1 に存在する癌抑制遺伝子が関係しているらしい。それぞれ、肺扁平上皮癌、及び、皮膚の扁平上皮系の腫瘍と共通の癌抑制遺伝子と考えられる。

( 3 ) 上皮異形成の悪性化、癌化には p 5 3 などの細胞周期調整遺伝子の異常が関係しているらしい。9 p 2 2 に存在する癌抑制遺伝子も同じ段階に関与すると考えられる。

( 4 ) p 1 6 は食道扁平上皮癌に関与している



ことは明らかになった。しかし、癌化のどの段階に関与するのか、あるいは、どの程度の頻度で関与するのかは今後の検討課題である。



## Figure Legend

図 1、食道扁平上皮癌におけるアレロタイプスタディ。横軸は染色体番号（p は短腕、q は長腕）、縦軸は LOH % を示す。

図 2、第 17 染色体長腕における欠失地図。各 RFLP (VNTR) マーカーの染色体上へのマッピング（左）と各症例（上の数字）における欠失を示す（● は LOH, ○ は両アレルの保持）。右端の縦棒が共通欠失領域を示す。

図 3、上皮異形成におけるレプリケーションエラー (RER) を示した 2 例。症例 30345（右）では非連続性に併存する早期癌では RER (-) であることが示されている。

図 4、p16 遺伝子における 50 bp 欠失の例。左に PCR により 50 bp 欠失が示されている。右には各々の PCR バンドを DNA シークエンスした結果を示す。

図 5、食道扁平上皮癌における多段階発癌（説）。



## REFERENCES

- 1) Fearon,ER. and VogelsteinB. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61:759-767.
- 2) Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, et al.(1991) Identification of FAP locus genes from Chromosome 5q21. *Science*, 253,661-665.
- 3) Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, et al.(1991) Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 253,665-669.
- 4) Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. (1991) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 66,589-600.
- 5) Joslyn G, Carlson M, Thliveris A, et al. (1991) Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell*, 66,601-613.
- 6) Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, et al. (1991) Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated colorectal cancers. *Science*, 251, 1366-1370.
- 7) Ichii,S., Takeda,S., Horii,A., et al. (1993) Detailed analysis of genetic alterations in colorectal tumors from patients with and without familial adenomatous polyposis (FAP). *Oncogene*, 8:2399-2405.
- 8) Miyoshi,Y., Ando,Y., Nagase,H., et al. (1992) Germ-line mutations of the *APC* gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89,4452-4456



- 9) Fishel,R., Lescoe,M.K., Rao,M.R.S., et al. (1994) The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*,77,167.
- 10) Han,H-J.,Yanagisawa,A., Kato,Y., et al. (1993) Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res.*, 53:5087-5089.
- 11) Horii,A., Han,H-J, Shimada,M., et al. (1994) Frequent replication error at microsatellite loci in tumors of patients with multiple primary cancers. *Cancer Res.*, 54:3373-3375.
- 12) Sato,T., Tanigami,A., Yamakawa,K., et al. (1990) Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Res.*, 50: 7184-7189.
- 13) Aoki,T., Mori,T., Du,X.Q., et al. (1994) Allelotype study of Esophageal carcinoma. *Gen. Chrom. Cancer*, 10: 177-182.
- 14) Feinberg,AP. and Vogelstein,B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments for high specific activity. *Anal. Biochem.*, 137: 266-267.
- 15) Inazawa,J., Saito,H., Ariyama,T., et al. (1993) High-resolution cytogenetic mapping of 342 new cosmid marker including 43 RFLP markers on human chromosome 17 by fluorescent in situ hybridization. *Genomics*, 17: 153-162.
- 16) Yanagisawa A, Kato Y, Ohtake T, et al. (1990) c-Ki-ras point mutations in ductectatic-type mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 50, 7184-7189.



- 17) Yokoyama S, Yamakawa K, Tsuchiya E, et al. (1992) Deletion mapping on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res* 52: 873-877.
- 18) Huang,Y., Boynton,RF, Blount,PL., et al. (1992) Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer Res.*, 52: 6525-6530
- 19) Lukeis,R., Irving,L., Garson,M., et al. (1990) Cytogenetics of non-small lung cancer: analysis of consistent non-random abnormalities. *Gen. Chrom. Cancer* 2,: 116-124.
- 20) van der Riet,P., Nawroz,H., Hruban,R.H., et al. (1994) Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res.*, 54: 1156-1158.
- 21) Goudie DR, Yuille MAR, Affara NA, et al. (1993) Mapping of the gene for multiple self-healing squamous epithelioma by haplotype analysis in families with common ancestry. *Cytogenet Cell Genet* 64: 114.
- 22) Bonifas,J.M., Bare,J.W., Kerschmann,R.L., et al. (1994) Parental origin of chromosome 9q22.3-q31 lost in basal cell carcinomas from basal cell nevus syndrome patients. *Hum. Mol. Genet.*, 3:447-448.
- 23) Huang,Y., Meltzer,S.J., Yin,J., et al. (1993) Altered messenger RNA and unique mutational profiles of p53 and Rb in human esophageal carcinomas. *Cancer Res.*, 53: 1889-1894.
- 24) Wooster,R., Neuhausen,S.L., Mangion,J., et al. (1994) Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265: 2088-2090.

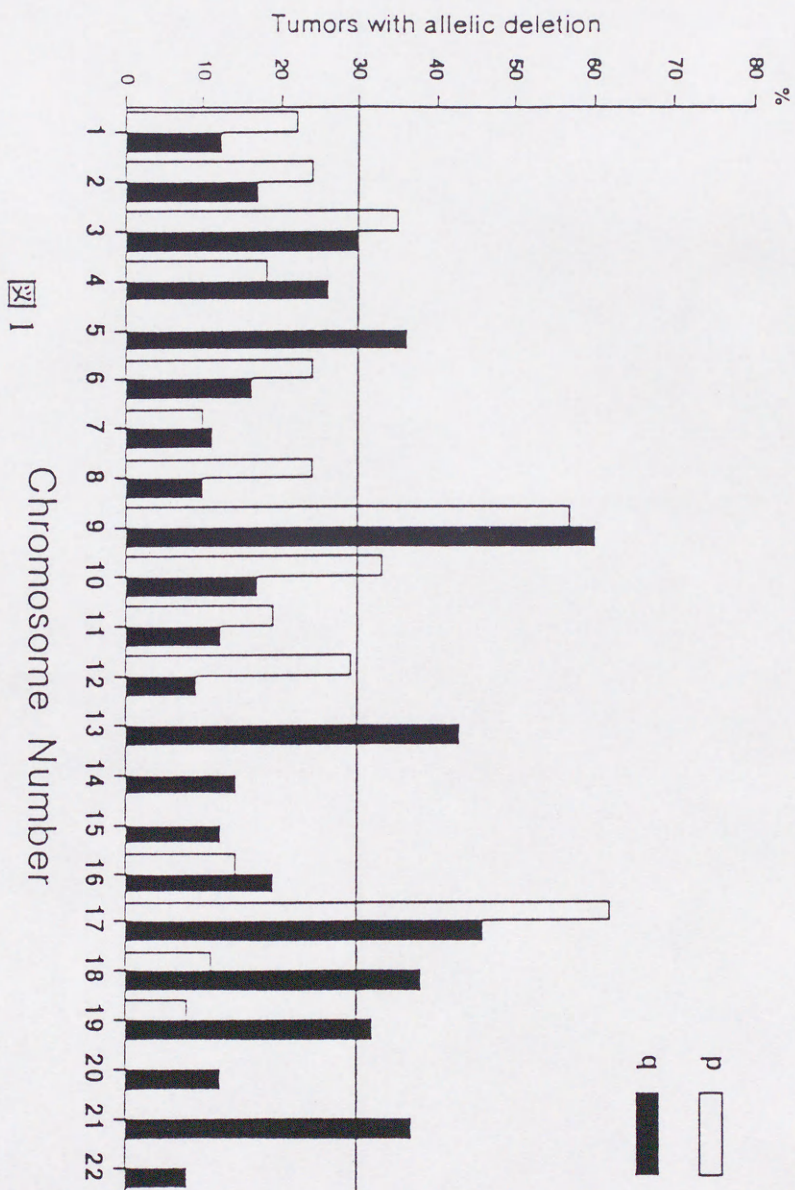


- 25) Hollstein,M.C., Metcalf,R.A., Welsh,J.A., et al. (1990) Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9958-9961.
- 26) Mori,T., Aoki,T., Matsubara,T., et al. (1994) Frequent loss of heterozygosity in the region including BRCA1 on chromosome 17q in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Cancer Res.*, 54, 1638-1640.
- 27) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 342, 705-708.
- 28) Vogelstein,B., Fearon,E.R., Kern,S.E., et al. (1989) Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*,244,207-244.
- 29) King,M.C., Rowell,S., and Love,S.M. (1993) Inherited breast and ovarian cancer. *JAMA*, 269,1975-1980.
- 30) Easton,D.F., Bishop,D.T., Ford,D., et al. (1993) Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 678-701.
- 31) Mori,T., Yanagisawa,A., Katoh,Y., et al. (1994) Accumulation of genetic alterations during esophageal carcinogenesis. *Hum. Mol. genet.*, 3: 1969-1971.
- 32) Mori,T., Yanagisawa,A., Katoh,Y., et al. (1994) 53rd Annual meeting of Japanese Cancer Association.
- 33) Mori,T., Miura,K., Aoki,T., et al. (1994) Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I gene in esophageal squamous cell carcinoma. 54, 3396-3397.



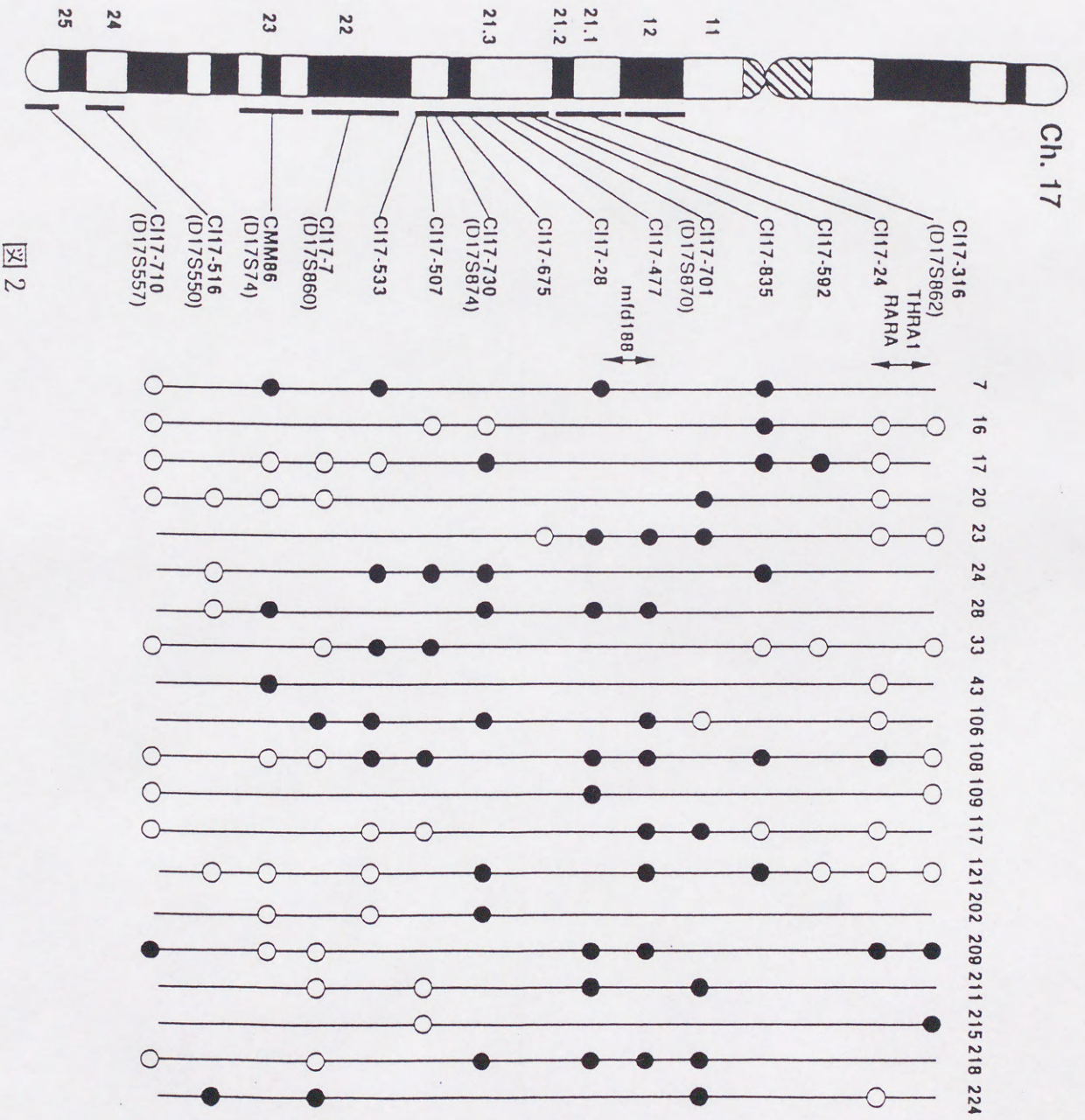
- 34) Miki,Y., Swensen,J., Shattuck-Eidens,D., et al. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266:66-71.
- 35) Risk,J.M., Field,E.A., Field,J.K., et al. (1994) Tylosis oesophageal cancer mapped. *Nature Genet.*,8,319-321.
- 36) Nakatsuru,S., Yanagisawa,A., Furukawa,Y., et al. (1993) Somatic mutations of the *APC* gene in precancerous lesion of the stomach. *Hum.Mol.Genet.*, 2:1463-1465.
- 37) Wagata,T., Shibagaki,I., Imamura,M., (1993). Loss of 17p, mutation of the *p53* gene, and overexpression of *p53* protein in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res.*, 53: 846-850.
- 38) Serrano,M., Hanson,G.J., and Beach,D. (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature(London)*, 366:704-707.
- 39) Hussussian,C.J., Struewing,J.P., Goldstein, A.M., et al. (1994) Germline *p16* mutations in familial melanoma. *Nature Genet.*, 8:15-21.
- 40) Kamb,A., Shattuck-Eidens,D., Eeles,R., et al. (1994) Analysis of the *p16* gene (*CDKN2*) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nature Genet.*, 8:22-26.
- 41) Aoki,T., Takeda,S., Yanagisawa,A., et al. (1994) *APC* and *p53* mutations in *de novo* colorectal adenocarcinomas. *Hum. Mut.*,3,342-346.







# Ch. 17





**図 3 、 An example of RER (+) case**

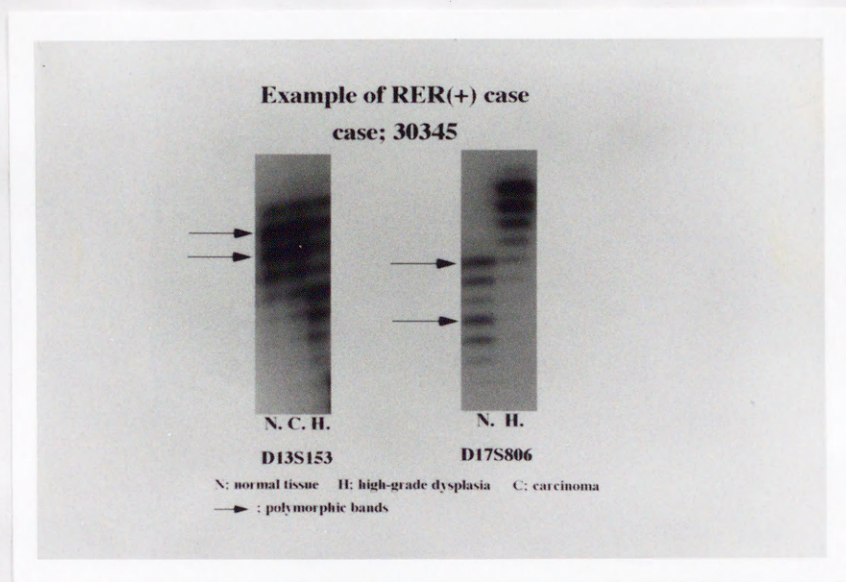
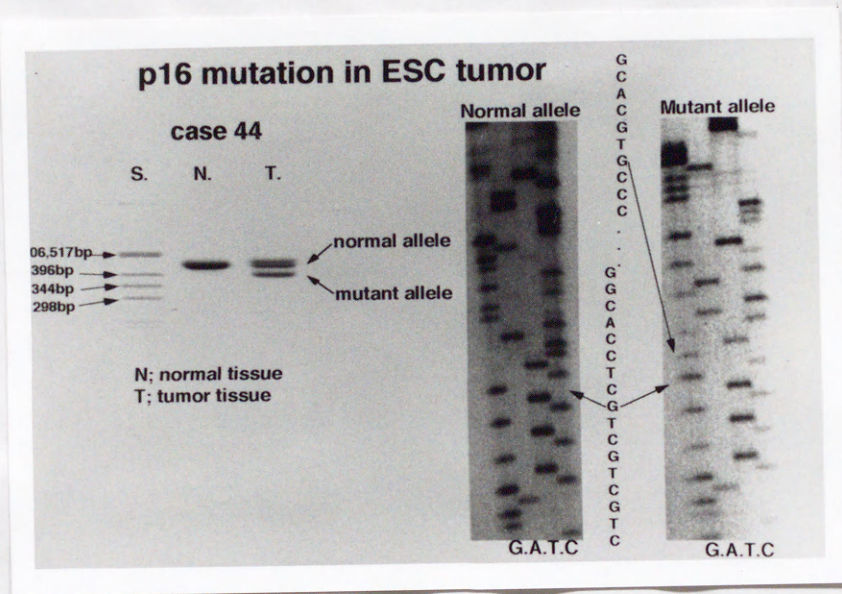




图 4 、 An example of *p16* gene mutation case





**図5 食道扁平上皮癌における多段階発癌**

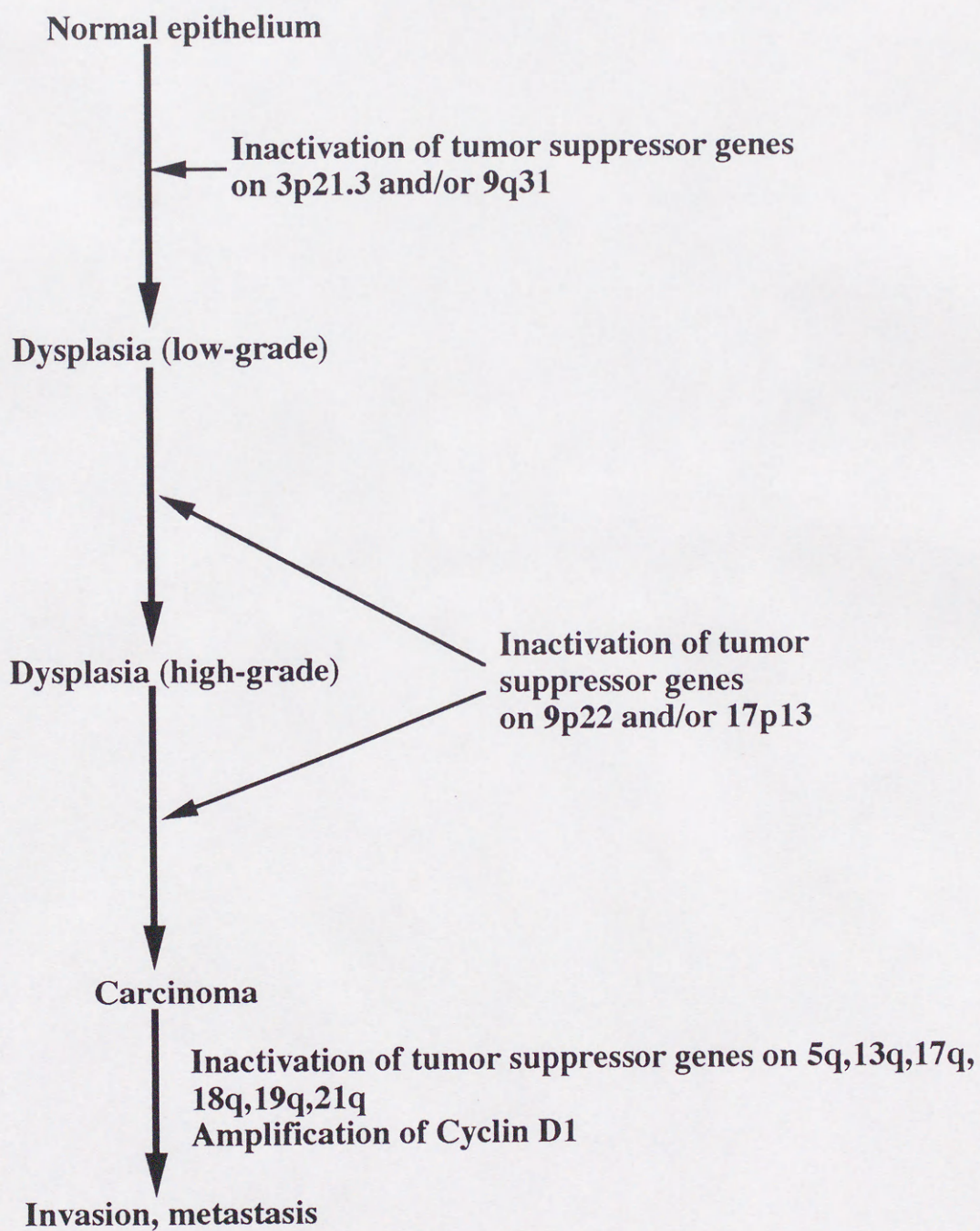




表 1

## Loss of heterozygosity in esophageal carcinoma

Chromosome location	Probe	Locus	Enzyme	No. of patients tested	Allelic loss / informative cases (%)
1p	MCT58 *	D1S77	TaqI	62	4 / 18 (22)
1q	HHH106	D1S67	MspI	65	3 / 25 (12)
2p	TBA85.7 *	D2S47	PvuII	72	10 / 41 (24)
2q	YNH24 *	D2S44	MspI	66	10 / 60 (17)
3p	C13-515 *	D3S685	MspI	60	15 / 47 (32)
3p	C13-373	D3S659	PvuII	66	10 / 29 (36)
total of 3p				75	19 / 55 (35)
3q	EFO64.2 *	D3S46	MspI	65	13 / 44 (30)
4p	YNZ32 *	D4S125	MspI	59	7 / 40 (18)
4q	EFO139.1 *	D4S163	MspI	58	9 / 35 (25)
5q	APC/cDNA	APC	MspI	76	5 / 21 (24)
5q	LS.71	D5S141	MspI	65	13 / 35 (37)
total of 5q				78	16 / 45 (36)
6p	C16-7 *	D6S139	PvuII	73	12 / 49 (24)
6q	C16-111 *	D6S193	TaqI	63	9 / 56 (16)
7p	RMU7.4	D7S370	MspI	64	2 / 20 (10)
7q	JCZ67 *	D7S396	RsaI	66	5 / 44 (11)
8p	C18-2125 *		TaqI	63	9 / 38 (24)
8q	C18-134 *	D8S177	MspI	64	4 / 42 (10) #
9p	HHH220	D9S18	TaqI	73	17 / 30 (57)
9q	MCT112	D9S15	MspI	64	9 / 22 (41)
9q	EKZ19.3	D9S17	TaqI	76	16 / 21 (75)
total of 9q				77	24 / 40 (60)
10p	MHZ15	D10S17	MspI	65	11 / 33 (33)
10q	EFO75.1 *	D10S25	TaqI	64	6 / 36 (17)
11p	Ha-RAS1 *	HRAS	MspI	60	4 / 21 (19)
11q	MCMP1 *	PYGM	MspI	60	5 / 42 (12) #
12p	THH14	D12S16	TaqI	72	2 / 7 (29)
12q	YNH15	D12S17	MspI	64	3 / 34 (9)
13q	MHZ47 *	D13S52	PvuII	70	23 / 53 (43)
14q	CMM101 *	D14S13	MspI	65	9 / 64 (14)
15q	THH55	D15S27	MspI	63	2 / 17 (12)
16p	CMM65 *	D16S84	TaqI	60	4 / 28 (14)
16q	CJ52.209M1	D16S151	MspI	64	8 / 43 (19)
17p	YNZ22 *	D17S30	TaqI	74	40 / 65 (62)
17q	C117-730 *	D17S874	MspI	90	20 / 35 (57)
17q	CMM86 *	D17S74	TaqI	80	20 / 54 (37)
total of 17q				91	32 / 70 (46)
18p	B74	D18S3	MspI	64	2 / 18 (11)
18q	OS4	D18S5	TaqI	65	11 / 29 (38)
19p	JCZ3.1 *	D19S20	RsaI	61	2 / 25 (8)
19q	EFO4.2 *	D19S22	PvuII	73	11 / 34 (32)
20q	CMM6 *	D20S19	TaqI	60	7 / 59 (12)
21q	MCT15 *	D21S113	MspI	64	11 / 30 (37)
22q	EFZ31	D22S32	MspI	64	1 / 13 (8)

\* Variable number of tandem repeat markers.

# Amplification of alleles were observed; frequency is described in the text.



表2. Allelic losses at loci on chromosome17q in esophageal squamous cell carcinomas

Probe name	Chromosome localization	Enzyme	No. of cases tested	Allelic losses/informative cases (%)
CI17-316	17q12-q21.1	MspI	77	9/32 (37)
CI17-24	17q21.1-q21.2	TaqI	86	13/36 (36)
CI17-592	17q21.3	EcoRI	80	6/17 (35)
CI17-835	17q21.3	TaqI, MspI	70	21/44 (48)
CI17-701	17q21.3	TaqI	75	21/38 (55)
CI17-477	17q21.3	TaqI	74	22/32 (69)
CI17-28	17q21.3	MspI	74	15/26 (58)
CI17-675	17q21.3	EcoRI	66	3/7 (43)
CI17-730	17q21.3	TaqI, MspI	90	20/35 (57)
CI17-507	17q21.3	MspI	80	10/18 (56)
CI17-533	17q21.3	TaqI	62	21/42 (50)
CI17-7	17q22	PvuII	88	16/33 (48)
CMM86	17q23	TaqI	82	20/54 (37)
CI17-516	17q25.1	TaqI	82	14/26 (54)
CI17-710	17q25.3	PvuII, MspI	69	11/40 (28)



表 3

Candidate loci on chromosome 3p, 9p, 9q, and17p

Canidate locus	Reference	Methodology
3p21.3	Yokoyama, S., et al. (Cancer Res.1992)	Deletion mapping in SCC of the lung
9p21-22	Lukeis, R., et al. (Genes, Chrom. &Cancer) van der Riet, P., et al. (Cancer Res.1994)	Cytogenetic analysis of NSC lung cancer Deletion mapping in head and neck cancer
9q22-31	Goudie, D.R., et al. (Nature Genet., 1993)	MSS1 linkage analysis
17p13 (p53)	Hollstein, M.C., et al. (Pro.Natl.Acad.Sci,1990)	p53 mutation in esophageal cancer



表 4

The microsatellite regions examined in this study

microsatellite regions	Chromosomal localization
CI3-771(D3S966)	3p21.3
CI3-398(D3S663)	3p21.3
CI3-830(D3S1007)	3p21.3-22
D5S433	5q21
LNS-CA(D5S346)	5q(APC)
D9S157	9p22-pter
D9S161	9p22-pter
D9S58	9q22.3-q31
mfd220	9q31
D13S153	13q14.2-14.3
p53-CA	17p(P53)
D17S796	17p13
D17S806	17q
mfd188(D17S579)	17q21
D18S61	18q
D19S220	19q



表5 a Correlation of LOH on Chromosome 17q  
with Sex of Patients with Esophageal Cancer

Sex	LOH on 17q		
	Retained	Loss	Total
Male	36	20 ( 36% )	56
Female	2	12 ( 86% )	14

p= 0.0009 (Fisher's exact test )



表 5 b Correlation of LOH on Chromosome 19q  
with Regional Lymph Node Metastasis

Regional Lymph Node Metastasis	LOH on 19q	
	Retained	Loss
negative	15	2
positive	8	9

p = 0.0128 (Fisher's exact test )



表 6. LOH on 17q and additional allele losses in tumors of female patients.

case	17q	other chromosomal deletions*
#2	loss	3p,3q,6q,10q,13q,14q,17p,19q
#7	loss	1q,3p,5q,10p,12q,13q,17p
#15	loss	1p,3q,13q,16p,17p,21q
#17	loss	10p
#22	loss	4q,5q,9q,17p
#24	loss	1p,2q,22q
#32	retain	1p,2p,3p,5q,9q,21q
#33	loss	not examined
#36	loss	6q,9q
#41	loss	2p,2q,4q,6q,9q,18p,21q
#44	loss	3p,4q,6p,7q,8p,9q,10q,11p,11q,13q,17p
#45	loss	13q,18q
#49	retain	not examined
#50	loss	2p,2q,7q
#105	loss	not examined
#109	loss	2p,3q,10p,13q,17p
#110	loss	3p,6p,7p,8q,9q,15q,16q,17p,21q
#203	loss	9q,17q
#221	retain	not examined

LOH on 17q was observed in 16 cases of 19 female with at least one marker of 15 RFLP markers.

\*Probes used in this study were as follows; MCT58(1p), HHH106(1q), TBA85.7(2p), YNH24(2q), CI3-515(3p), CI3-373(3p), EFD64.2(3q), YNZ32(4p), EFD139.1(4q), APC(5q), LS.71(5q), CI6-7(6p), CI6-111(6q), RMU7.4(7p), JCZ67(7q), CI8-2125(8p), CI8-134(8q), HHH220(9p), MCT112(9q), EKZ19.3(9q), MHZ15(10p), EFD75.1(10q), c-Ha-RAS1(11p), MCMP1(11q), THH14(12p), YNH15(12q), MHZ47(13q), CMM101(14q), THH55(15q), CMM65(16p), CJS2.209M1(16q), YNZ22(17p), B74(18p), OS4(18q), JCZ3.1(19p), EFD4.2(19q), CMM6(20q), MCT15(21q), EFZ31(22q).



表 7. Frequency of LOH at microsatellite loci on nine chromosomal arms in dysplasia and ESCs

Chromosomal arm	Dysplasia	Early carcinoma (ep,mm,sm)
LOH/informative cases (%LOH)		
3p	8/9(89)	9/14(64)
5q	1/8(13)	1/19(5)
9p	2/11(18)	5/17(29)
9q	4/8(50)	7/13(54)
13q	2/8(25)	2/18(11)
17p	2/8(25)	7/16(44)
17q	1/8(13)	3/17(18)
18q	1/5(20)	2/9(22)
19q	0/4(0)	1/15(7)



表 8 . LOH study in dysplasia and early stage of esophageal cancer  
on four candidate loci; 3p21.3, 9p22, 9q31, 17p13(TP53 locus)

Pathological diagnosis	low-grade dysplasia	high-grade dysplasia	carcinoma (epi,mm,sm)
3p21.3    retain loss	1 6	0 2	5 9
9p22      retain loss	7 0	2 2	12 5
9q31      retain loss	4 2	0 2	6 7
17p13    retain loss	5 0	1 2	9 7



表 9 LOH analysis in five cases of esophageal carcinomas  
with dysplastic lesions

Case No.	Pathological Diagnosis	LOH at each chromosomal arm			
		3p21.3	9q31	9p22-ter	17p13
19815	LGD	R	L	R	R
	C (epi)	R	L	L	R
	LGD	NI	L	R	R
30497	LGD	NI	L	L	L
	HGD	NI	L	L	L
	C (epi)	NI	L	L	L
31587	LGD	L	L	R	R
	HGD	L	L	R	R
	C (epi)	L	L	L	R
19182	HGD	L	R	L	R
	C (epi)	L	R	L	L
	C (mm)	L	L	NT	R
30479	LGD	NI	L	R	R
	C (epi)	NI	L	L	L
	C (epi)	NI	L	L	L

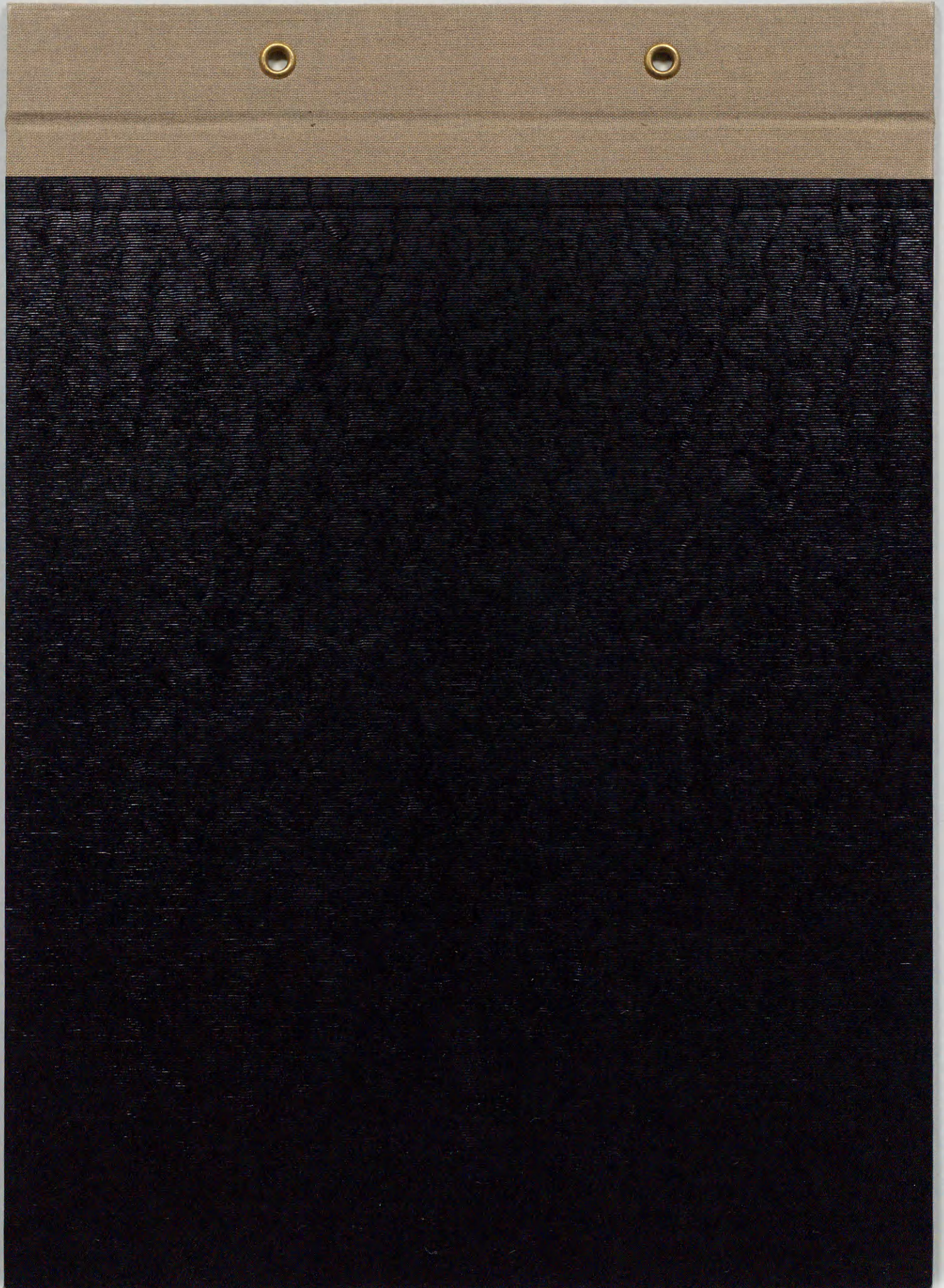
L; loss of heterozygosity R; retention of both allele  
 NI; not informative NT; not tested  
 LGD; low grade dysplasia HGD; high grade dysplasia  
 C; carcinoma



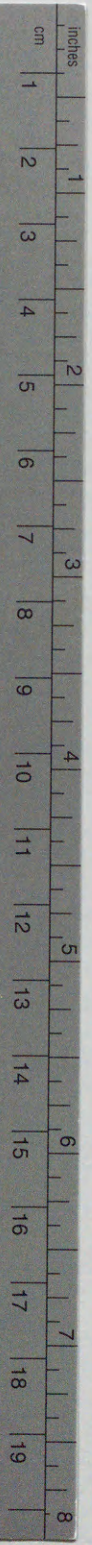
表 10. Mutations of *MTS1/CDK4I* gene in ESC patients.

case	nucleotide change	coding change
19	ATGGGCAGC->ATGGCAGC(codon47)	1 bp deletion
44	CACGGC...CACGAC->CACAC (codon59-76)	52 bp deletion
114	GCG->ACG(codon60)	Asp->Asn
36	TGC->GGC(codon64)	Cys->Gly
111	GAC->AAC(codon66)	Asp->Asn
37	ACCCGACCC->ACCCACCC(codon72)	1 bp deletion
28	GAC->AAC(codon76)	Asp->Asn
48	CGGCTGGAC->CGGTGGAC(codon96)	1 bp deletion
110	CGGCTGGAC->CGGTGGAC(codon96)	1 bp deletion
117	CTGGACGTG->CTGACGTG(codon97)	1 bp deletion
11	CGC->CAC(codon116)	Arg->His
23	CGGCGCACC->GGGCACC(codon128)	2 bp deletion
22	CGC->TGC(codon136)	Arg->Cys
46	GGCGCATA->GCCGCATA(codon136)	1 bp deletion









# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

